基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003803

HSF1在HBx促进肝细胞癌进展中的作用研究

展宗祝，汪春朵，何思怡，李燃燃，张吴芝宜，冯彬彬，任吉华
（重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨热休克转录因子1（heat shock transcription factor 1，HSF1）在乙型肝炎病毒X蛋白（hepatitis B virus X protein，HBx）促进肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）细胞迁移、侵袭中的重要作用，并初步研究HSF1介导HBx促进HCC进展的作用机制。**方法：**通过4D Label-free定量蛋白质组学和Western blot检测发现HBx对HSF1表达水平的影响；在Huh7和MHCC97H肝癌细胞系中过表达HBx，运用RT-PCR、Western blot检测HBx对HSF1 mRNA、蛋白质水平、HBx蛋白稳定性的影响；运用TCGA数据库分析HSF1在HBV相关性肝癌组织中的表达水平及其与肝癌分期分级、患者预后的关系，并通过Western blot检测HSF1在HBV相关性肝癌组织中的表达水平；在HCC细胞中过表达HBx并敲减HSF1或用HSF1特异性抑制剂KRIBB11处理细胞，运用Transwell迁移和侵袭实验、划痕实验及F-肌动蛋白染色实验，分析HSF1在HBx促进HCC细胞迁移和侵袭中的作用；运用GEO数据集和HCMDB数据库分析HSF1的下游靶点，并鉴定下游靶点c-Myb在HSF1介导HBx促进HCC进展中的作用。**结果：**HBx上调HSF1蛋白质水平而对其mRNA水平无明显影响，HBx通过增强HSF1的蛋白稳定性促进其表达；HSF1在HBV相关性肝癌组织中高表达，HSF1高表达与肝癌分期分级、患者不良预后相关；HBx过表达明显促进Huh7和MHCC97H细胞的迁移、侵袭、划痕愈合能力和伪足形成能力，而HSF1敲减或KRIBB11处理显著减弱HBx促进HCC细胞迁移和侵袭；HSF1促进转移相关蛋白c-Myb的表达，在HSF1敲减的HCC细胞中过表达c-Myb恢复HBx对HCC细胞迁移和侵袭的促进作用。**结论：**HBx增强HSF1蛋白稳定性并促进其表达，HSF1上调c-Myb在HBx促进HCC细胞迁移和侵袭中发挥重要作用，靶向HSF1可能有助于减缓HBV相关性HCC进展。

【关键词】热休克转录因子1；乙型肝炎病毒X蛋白；肝细胞癌；迁移；侵袭
【中图分类号】R735.7 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2024-11-27

Investigation of the role of HSF1 in HBx-driven progression of hepatocellular carcinoma

Zhan Zongzhu, Wang Chunduo, He Siyi, Li Ranran, Zhang Wuzhiyi, Feng Binbin, Ren Jihua
(*Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases Designated by the Chinese Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the role of heat shock transcription factor 1 (HSF1) in hepatitis B virus X protein (HBx)-driven migration and invasion of hepatocellular carcinoma (HCC) cells, and to preliminarily explore the mechanism of HSF1 mediating HBx-driven HCC progression. ***Methods*:** 4D label-free quantitative proteomics and Western blot were used to analyze the effect of HBx on HSF1 expression. HBx was overexpressed in the HCC cell lines Huh7 and MHCC97H, and its impact on the mRNA and protein levels and stability of HSF1 was assessed by RT-PCR and Western blot. The Cancer Genome Atlas database was used to analyze the expression of HSF1 in hepatitis B virus (HBV)-associated HCC tissues and its relationship with tumor stage/grade and patient prognosis, and Western blot was used to measure the expression of HSF1 in HBV-associated HCC tissues. HBx was overexpressed in HCC cells, followed by HSF1 knockdown or cell treatment with the HSF1 inhibitor KRIBB11, and Transwell migration and invasion assay, scratch assay, and F-actin staining experiment were performed to analyze the role of HSF1 in HBx-driven HCC cell migration and invasion. GEO and HCMDB datasets were used to identify the downstream target of HSF1, and the role of downstream target c-Myb in HSF1-mediated HBx-driven HCC progression. ***Results*:** HBx upregulated HSF1 protein levels without significantly affecting its mRNA expression, through enhancing HSF1 protein stability. HSF1 was highly expressed in HBV-associated HCC tissues, and its elevated expression correlated with tumor stage/grade and poor prognosis. HBx overexpression significantly promoted the migration, invasion, wound-healing capacity, and pseudopodia formation capacity of

作者介绍：展宗祝，Email：zhanzongzhu@stu.cqmu.edu.cn，研究方向：肝细胞癌发病机制。
通信作者：任吉华，Email：renjihuav@163.com。
基金项目：重庆市自然科学基金面上资助项目（编号：CSTB2022NSCQ-MSX0864）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20250314.0847.006（2025-03-14）

Huh7 and MHCC97H cells, while HSF1 knockdown or KRIBB11 treatment significantly attenuated the HBx-driven migration and invasion of HCC. HSF1 promoted the expression of the metastasis-associated protein c-Myb, and c-Myb overexpression in HSF1-knockdown HCC cells restored the promotive effect of HBx on HCC cell migration and invasion. ***Conclusion***: HBx enhances HSF1 protein stability to promote its expression. Upregulation of c-Myb by HSF1 plays a pivotal role in HBx-driven HCC cell migration and invasion. Targeting HSF1 may help to delay the progression of HBV-associated HCC.

【Key words】heat shock transcription factor 1 (HSF1); HBx; hepatocellular carcinoma (HCC); migration; invasion

肝细胞癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是全球范围内发病率和死亡率较高的恶性肿瘤之一，严重威胁人类生命健康[1]。近年来虽然早期诊断技术和外科治疗技术有一定提高，但是HCC患者行根治性手术后的5年死亡率仍高达40%~60%，高复发转移率是HCC致死的主要原因[2]。在中国，慢性乙型肝炎病毒（hepatitis B virus，HBV）感染被认为是HCC发生的主要致病因素之一[3]，其中HBV编码的乙肝病毒X蛋白（hepatitis B virus X protein，HBx）在HCC的发生与进展中发挥着至关重要的作用[4]。HBx通过参与细胞信号转导[5]、细胞氧化应激、细胞凋亡、DNA修复、基因组不稳定性等过程[6]，对HCC细胞的增殖、凋亡、转移、侵袭等发挥重要的调控作用[7]。研究发现，HBx在HCC细胞生长中发挥双向调控作用，既可以通过抑制肿瘤抑制蛋白p53引起的细胞凋亡，干扰细胞周期，激活磷脂酰肌醇3-激酶通路、抑制糖原合成酶激酶3β活性等促进细胞增殖[8]；也可通过提高细胞内钙离子（Ca^{2+}）浓度，促进释放细胞色素C，抑制Bcl-2家族，激活p38和JNK信号通路诱导细胞凋亡[9]。因此，HBx在HBV相关性肝癌发生发展过程中体现出促凋亡和抑制凋亡交替的矛盾作用，而HBx在促进肝癌细胞转移过程中的作用更为明确。HBx主要通过诱导上皮-间充质转化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）、促进基质金属蛋白酶产生、细胞骨架重排和伪足突起的发育[9]以及激活细胞表面粘附分子CD44[10]等多种抑制增强HCC细胞的侵袭转移能力。基于肝癌细胞转移是HCC高致死率的主要原因，进一步理解HBx促转移的作用机制，对于发展新的治疗手段，降低HCC死亡率具有重要的意义。

热休克因子1（heat shock factor 1，HSF1）是一种普遍表达的转录因子，在正常细胞中处于潜伏状态，而细胞暴露于应激因素时，HSF1则被激活，诱导产生热休克蛋白（heat shock protein，HSP），保持蛋白质稳态，在肿瘤增殖、迁移、侵袭等方面发挥重要作用[11]。有意思的是肿瘤细胞也可通过抑制腺苷酸活化蛋白激酶激活HSF1[12]。研究发现，HSF1可通过促进转化生长因子β（transforming growth factor beta，TGF-β）和C-X-C基序趋化因子配体12（C-X-C motif chemokine ligand 12，CXCL12）（SDF-1）的表达，诱导EMT转化，与精氨酸结合蛋白相互作用重塑细胞骨架增强癌细胞迁移能力等机制促进癌细胞转移侵袭[13]。此外，HSF1也可通过促进HSP27的表达和磷酸化促进HCC的侵袭和转移[14]。而HSF1在HBx诱导的肝癌侵袭转移过程中作用的研究报道还十分少见。本研究基于4D Label-free定量蛋白质组学和Western blot分析发现HBx可促进HSF1的表达，进一步阐明了HSF1在HBx促进HCC细胞迁移和侵袭中的作用，分析了靶向HSF1是否拮抗HBx的作用，初步探讨了HSF1介导HBx促进HCC细胞迁移和侵袭的分子机制。

1 材料与方法

1.1 组织标本、细胞、质粒及siRNA

组织标本：人HBV相关肝癌组织及非HBV相关肝癌组织来源于重庆医科大学第一附院，本研究方案通过重庆医科大学医学研究伦理委员会审批同意（审批编号：2024131）。

人肝癌细胞系HCCLM3购自复旦大学附属中山医院肝癌研究所；人肝癌细胞系Huh7购自中国科学院上海细胞库；人肝癌细胞系MHCC97H购自复旦大学附属中山医院肝癌研究所。

pcDNA3.1-2×HA-HBx由复旦大学基础医学院陈捷亮教授馈赠并由本实验室长期保存；HBV表达质粒pCH9/3091、乙型肝炎病毒表面抗原（hepatitis B virus surface antigen，HBsAg）、乙型肝炎病毒多聚酶（hepatitis B virus polymerase，HBp）、乙型肝炎病毒核心抗原（hepatitis B core antigen，HBcAg）表达质粒由本实验室长期保存；将c-Myb基因插入到pcDNA3.1 His/Myc质粒（Invitrogen公司，美国Carlsbad）中，构建c-Myb过表达质粒。

针对HSF1基因的特异性siRNA序列及HSF1、c-Myb、S100A9、TSPAN8等引物由北京擎科生物科技股份有限公司设计合成和纯化（表1和2）。

表 1 siHSF1 序列

引物	序列（5′~3′）
siHSF1 正义链	CGGACGUGCAGCUGAUGAA
siHSF1 反义链	UUCAUCAGCUGCACGUCCG

表 2 qPCR 引物序列

引物	序列（5′~3′）
F-β-actin	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT
R-β-actin	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
F-CLIC3	CGGAGGAGGAGAAGCTGA
R-CLIC3	GCCCTCCTGGTTTCTGTTGT
F-c-Myb	GCGAAGGAGTTCTAAGGCGA
R-c-Myb	CCGGTAGCTGTCCTGTGAAG
F-CRYAB	TGGAGAGTGACGACTTCGTC
R-CRYAB	TCTGGGTCATCAGCGTACTG
F-DLL4	GACATCGAGATCGAGACAGG
R-DLL4	TGCCTCCTCCTTGAGGATTT
F-HSF1	CTACGCCCCTGATGCTGT
R-HSF1	GGGCCTCTCGTCTATGCTC
F-NUPR1	GAGGCTTGCATCCTCCTTCT
R-NUPR1	TCCAGGCGGTCTTCACTTAC
F-OLR1	GCCAGGAAGACCATCATCTG
R-OLR1	TGGCATCTGTGAGGTCAATC
F-PLAUR	CTACAGCCACCAAGTGCAAA
R-PLAUR	GCCAGCCTTGTAGTCAAGTG
F-RICTOR	CTGTTGACCTCGTTGGTGAG
R-RICTOR	GAGCGACAGCTCATCATCAC
F-S100A9	CCTGTAGGGAAGCTGGAGTC
R-S100A9	GTCCAGGGTCCAGGTTGTTA
F-SLPI	GCCTGTGGAAGAAGATCAGC
R-SLPI	CCCTTGATGTTGTGCTTGTC
F-SNCG	TGGCTTTGCTTGACATTCTG
R-SNCG	TGTCCCTTTAGGTTGGCTTG
F-TSPAN8	CACTGGATCTGCACGTTGAT
R-TSPAN8	TCTCCTGTGGTAGTCCTGGA
F-UBE2V1	TGTGTGCGTGTTGTCCTTTC
R-UBE2V1	CAGGGTCTGGAAGTCGAAAG

1.2 试剂

DMEM 培养基购自美国 Sigma 公司；胎牛血清购自上海双泓生物科技有限公司；青霉素-链霉素购自美国 Gibco 公司；Lipofectamine™3000 转染试剂（Lipo-fectamine™ 3000 Transfection Reagent）购自美国 Invitrogen 公司；BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自美国 Thermo 公司；Cell Counting Kit-8 试剂盒购自美国 MCE 公司；PVDF 膜购自美国 GE 公司；化学发光底物 ECL 购自德国 Millipore 公司；8 μm Transwell 小室、8μm 侵袭小室购自美国 Corning 公司；结晶紫染料购自美国 Sigma 公司；HSF1 抑制剂 KRIBB11 购自美国 MCE 公司（货号：HY-100872）；CHX（Cycloheximide）购自德国 Selleck 公司（货号：S7418）；HSF1 抗体、HA 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司（货号：51034-1-AP、66006-2-Ig）；GAPDH 抗体购自北京中山金桥生物技术有限公司（货号：TA-08）；c-Myb 抗体购自英国 Abcam 公司（货号：ab109127）。DyLight 488 Phalloidin 购自美国 CST 公司（货号：12935S）；引物自行设计并由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 Huh7 细胞、MHCC97H 细胞均培养于 DMEM 培养（含 10% 胎牛血清和 1% 的青-链霉素），培养于 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中。

1.3.2 细胞转染 在 Huh7 细胞系、MHCC97H 细胞系中进行质粒及 siHSF1 转染。取对数生长期的 Huh7 细胞、MHCC97H 细胞分别以 2×10^5 个/孔、3×10^5 个/孔的密度接种于 12 孔板中，待细胞融合度达到 70%~90% 时，进行细胞转染。提前 30~60 min 更换无血清培养基，并按照 Lipofectamine™ 3000 转染试剂盒说明书进行转染，转染 8 h 后更换新鲜培养基。

1.3.3 Western blot 实验 提取细胞总蛋白质，BCA 法检测蛋白质的浓度。取 30 μg 的蛋白质用 10% 的 SDS-PAGE 分离，然后在 90 V 恒压下进行湿转，将蛋白质转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后加入 HSF1（1∶7 000）、HA-HBx（1∶3 000）、GAPDH（1∶10 000）等一抗，4 ℃孵育过夜。第 2 天用 1×TBST 洗去游离抗体，加入 HRP 标记的山羊抗小鼠（1∶5 000）或山羊抗兔 IgG（1∶3 000）二抗，室温孵育 2 h；1×TBST 洗膜 3 次，每次 10 min。ECL 显影，以 GAPDH 为内参。

1.3.4 细胞活力测定 将处理好的 Huh7 细胞和 MHCC97H 细胞分别以每孔 1×10^3 个细胞的密度接种在 96 孔板中，每组 3 个孔。培养至相应时间后，每孔中加入 10 μL CCK-8 溶液，孵育 2 h。使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度（absorbance，A）值。

1.3.5 Transwell 迁移/侵袭实验 使用 8 μm Transwell 小室、8 μm 侵袭小室进行实验，分别将 2×10^5 个 Huh7 细胞和 1×10^5 个 MHCC97H 细胞培养在无血清培养基的小室内，小室外加入含 10% 胎牛血清的培养基。培养 20~24 h 后取出，用甲醇室温固定小室 30 min 后结晶紫染色 10 min，清洗小室并将小室内部的细胞拭去后于显微镜下拍照记录，随机选取 6 个区域进行细胞计数。

1.3.6 划痕实验 将密度为 90% 的 Huh7 细胞和 MHCC97H 细胞铺于 6 孔板中，待细胞贴壁并形成均匀单层细胞后，使用 200 μL 无菌移液器尖端在单层细胞表面制造划痕伤口，分别于划痕后 0 h 和 48 h 在 Incucyte ZOOM 活细胞成像仪中拍摄细胞图像并使用 ImageJ 对伤口宽度进行量化，计算细胞迁移率。

1.3.7 F-肌动蛋白染色和丝状伪足分析 细胞以 3×10^4 个/孔的密度接种于黏附的载玻片上，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养 24 h。随后使用 PBS 冲洗，再使用 4% 多聚甲醛固定细胞。用含 0.1%TritonX-100 的 PBS 洗涤 3 次后，在室温避光条件下使用鬼笔环肽（Actin-Tracker Green-phalloidin）进行 F-actin 染色 15 min，使用 DAPI 进行细胞核复染。使用激光共聚焦显微镜成像。使用 Image J 对细胞丝状伪足进行定量分析。

1.4 统计学方法

统计学分析采用Graphpad Prism 9.5软件进行，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）的形式呈现。2组数据比较采用两独立样本t检验。数据来自至少3个独立重复实验的结果。检验水准α=0.05。

2 结 果

2.1 HBx可能通过增强HSF1蛋白质稳定性增加其表达水平

为了进一步阐明HBx促进HCC进展的作用机制，本研究运用4D Label-free定量蛋白质组学分析了HBx过表达细胞与对照组细胞中的差异蛋白质，结果显示341个蛋白差异表达，其中经过HBx处理后表达水平上调的蛋白有201个（图1A），针对上调水平最高的前10个蛋白（B3GNT2、SYNE1、SIL1、GOLPH3L、IFT122、CEP192、PUDP、LTBR、HSF1、CLK3）进行验证，Western blot结果显示过表达HBx后，HSF1、CEP192、PUDP等蛋白质水平上调，其中HSF1表达水平升高最为明显（图1B），并且HSF1对多种肿瘤的进展具有促进作用。因此，本课题组聚焦到HSF1以进一步研究HBx促进HCC进展的作用机制。随后，在Huh7细胞系及MHCC97H细胞系中过表达HBx后检测其HSF1 mRNA及蛋白的表达水平，PCR结果显示过表达HBx后Huh7和MHCC97H细胞中HSF1 mRNA的表达水平无明显变化（图1C），Western blot结果显示过表达HBx后Huh7细胞和MHCC97H细胞中HSF1蛋白质明显升高（图1C）。进一步，用CHX处理细胞，Western blot实验结果显示，HBx过表达明显降低HSF1的降解速率，表明HBx表达增加了HSF1蛋白质稳定性（图1D）。此外，也在Huh7细胞中过表达HBV质粒pCH9/3091并检测HSF1蛋白质水平，结果显示HBV表达HBV导致HSF1蛋白质水平明显升高（图1E），而在Huh7细胞中过表达HBs、HBp、HBc表达质粒对HSF1蛋白质水平均无明显影响（图1F）。这部分结果表明在HBV表达肝癌细胞中，HBx可能通过增强HSF1蛋白质稳定性增加其表达水平。

2.2 HSF1在HBV相关HCC中高表达

接着分析了HSF1在肝癌组织中的表达水平及其与临床病理参数的相关性。TCGA数据库分析结果显示，HSF1

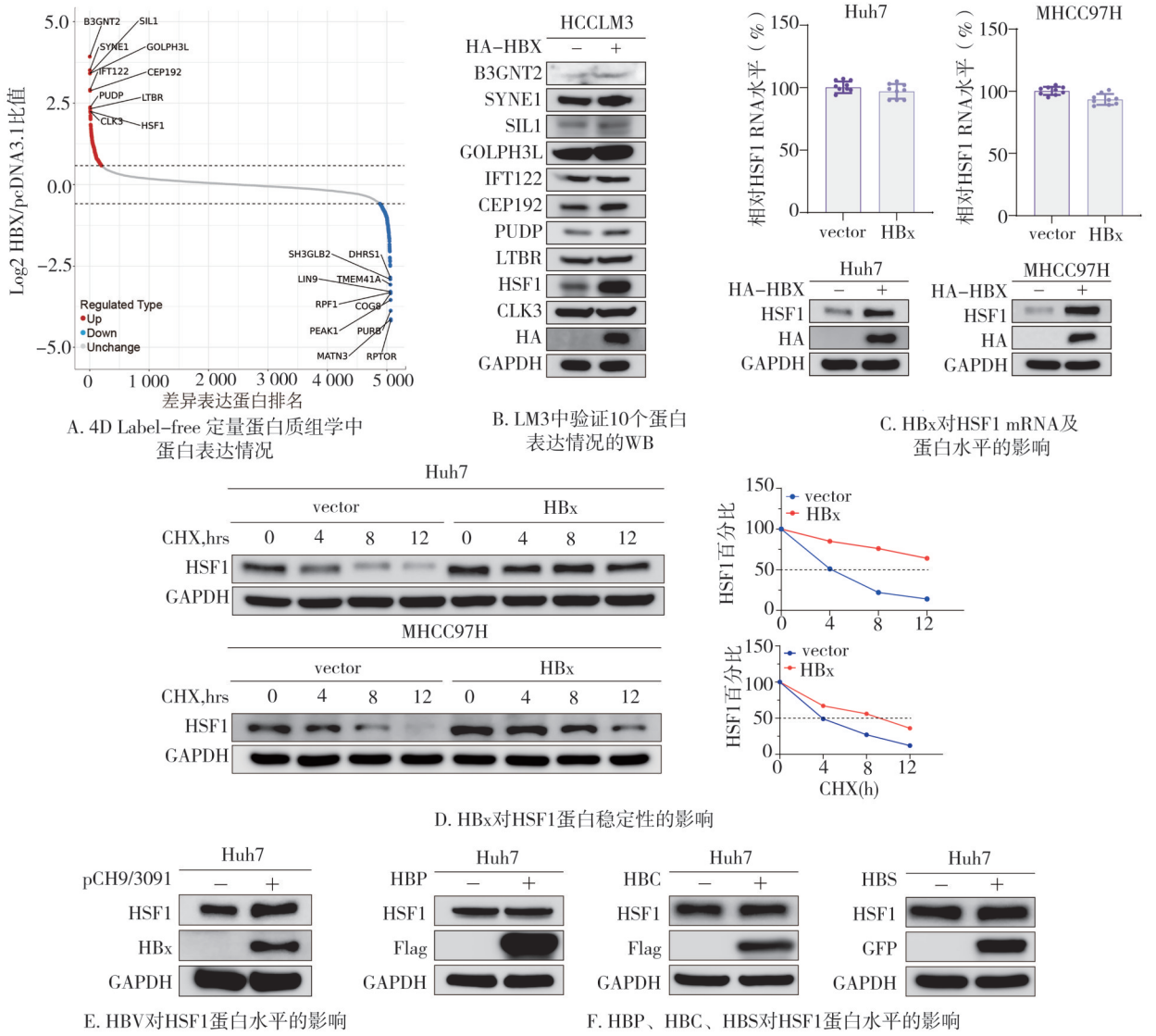


图1 HBx促进HSF1蛋白表达并增强其稳定性

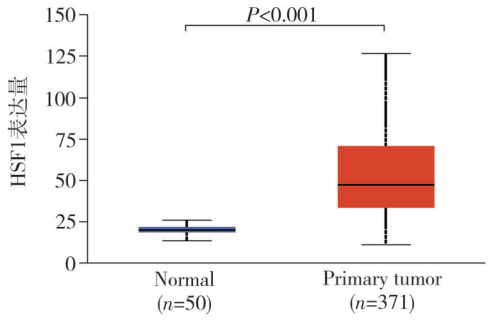
在HCC组织中高表达（图2A），HSF1高表达与肿瘤的分期（图2B）、分级（图2C）、不良预后（图2D）呈正相关，提示HSF1是HCC进展的危险因素。进一步收集了10例HBV相关肝癌组织及10例非HBV相关肝癌组织，Western blot检测结果显示，HSF1在HBV相关肝癌组织中的蛋白水平显著高于非HBV相关肝癌组织（图2E，$P<0.001$）。这些数据表明，HBV感染能够增加HCC组织中HSF1的表达水平，HSF1表达增加可能进一步加重HCC进展。

2.3　HSF1敲减减弱HBx对HCC细胞的迁移和侵袭能力

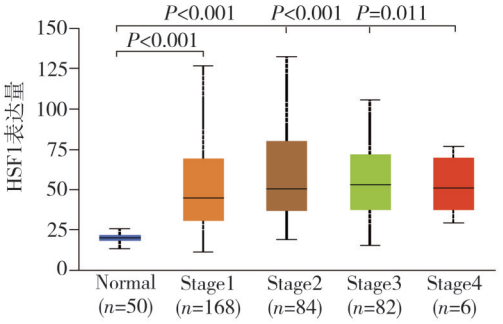
进一步，研究了HSF1在HBx促进HCC进展中的作用。首先在Huh-7和MHCC97H细胞中转染了HBx表达质粒和靶向HSF1的siRNA，Western blot验证了HBx的表达效率和HSF1的敲减效率（图3A）。在此基础上，运用细胞骨架染色实验发现，与对照组相比，HBx表达明显增加HCC细胞伪足形成的数量，而同时敲减HSF1明显减少了表达HBx的HCC细胞伪足数量（图3B，$P<0.001$）；划痕实验表明，与对照组相比，HBx表达增强了HCC细胞的划痕愈合能力，同时敲减HSF1减弱了表达HBx肝癌细胞的划痕愈合能力（图3C，$P<0.001$）；Transwell实验结果表明，与对照组相比，HBx表达增强了HCC细胞的迁移和侵袭能力，同时敲减HSF1减弱了表达HBx的HCC细胞迁移和侵袭能力（图3D，$P<0.001$）。这部分的结果表明HSF1敲减明显减弱HBx对HCC细胞迁移和侵袭能力的促进作用。

2.4　HSF1抑制剂减弱HBx对HCC细胞的迁移和侵袭能力

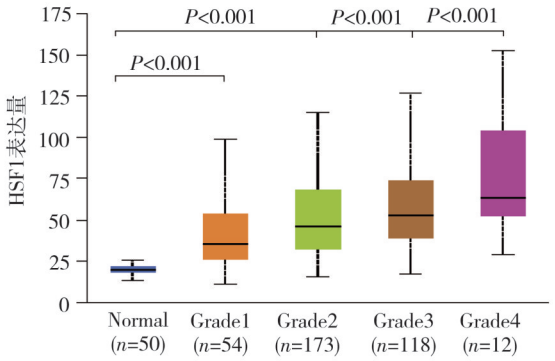
KRIBB11是一种靶向HSF1的小分子抑制剂，首先对Huh-7和MHCC97H细胞用不同浓度的KRIBB11处理，通过CCK8实验检测了KRIBB11的细胞毒性，结果显示KRIBB11在Huh-7细胞中的CC50值为8.59 μmol/L，在MHCC97H细胞中的CC50值为13.96 μmol/L（图4A）。接着，在Huh-7和MHCC97H细胞中转染了HBx表达质粒并用4 μmol/L KRIBB11处理细胞，Western blot检测了细胞中HSF1和HBx的蛋白质水平（图4B）；细胞骨架染色实验分析发现，与对照



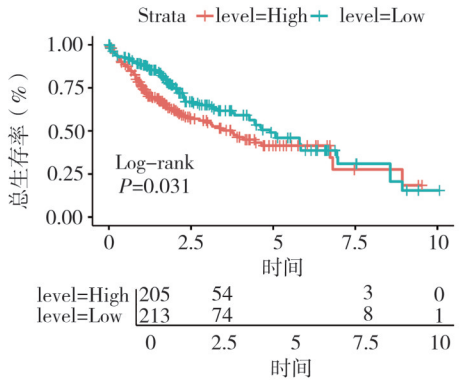
A. TCGA肝细胞癌数据集中HSF1 mRNA的表达情况



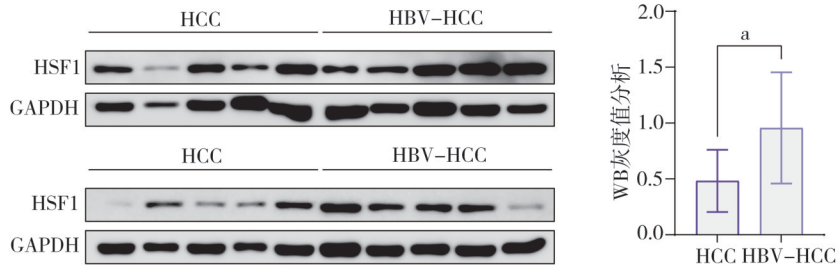
B. TCGA肝细胞癌数据集中HSF1表达水平与临床分期的关系



C. TCGA肝细胞癌数据集中HSF1表达水平与病理分级的关系



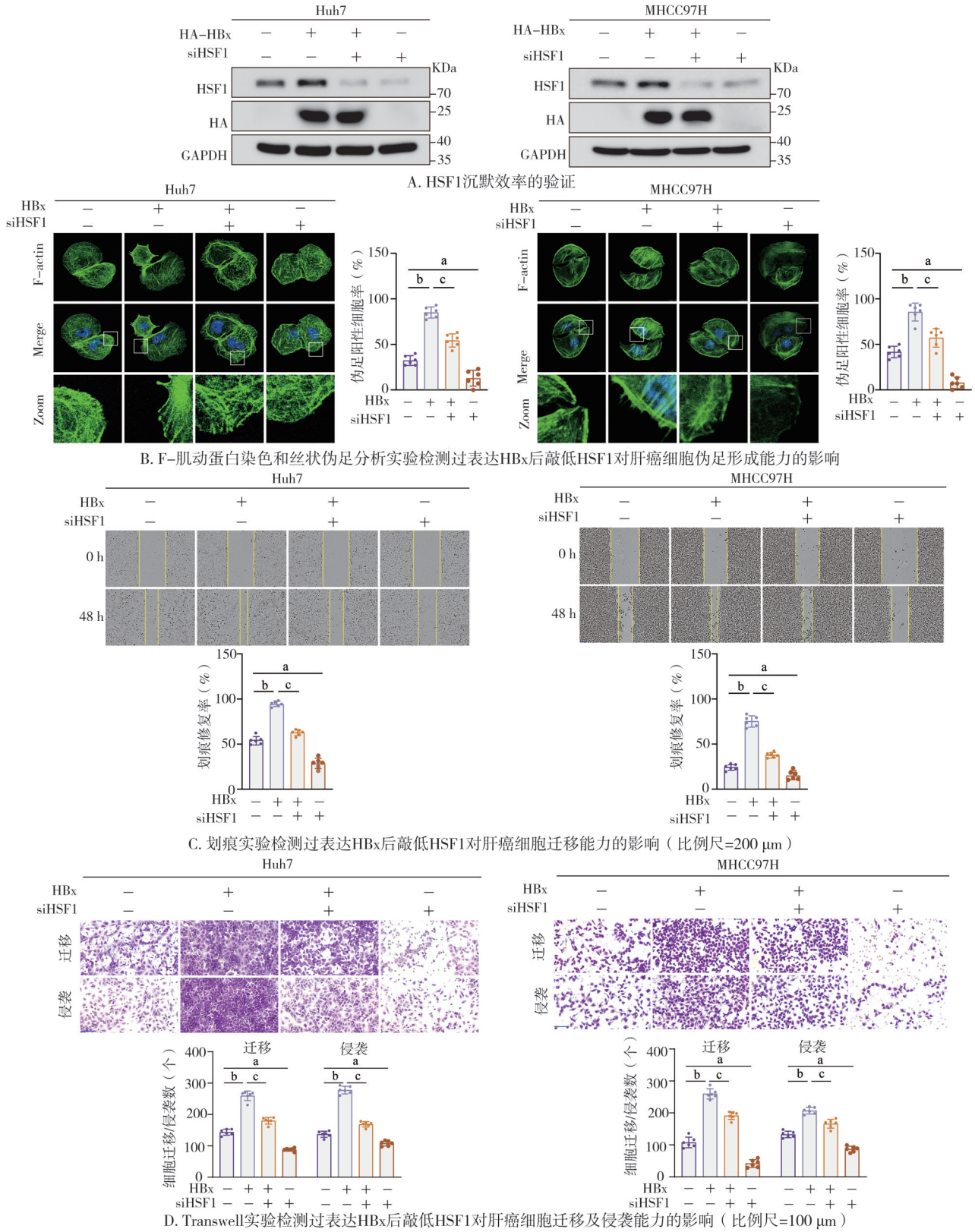
D. TCGA肝细胞癌数据集中HSF1的预后分析



E. HBV相关HCC组织及非HBV相关HCC组织中HSF1蛋白表达

注：a，与HCC组相比较，$P=0.017$

图2　HSF1在HBV相关HCC中高表达

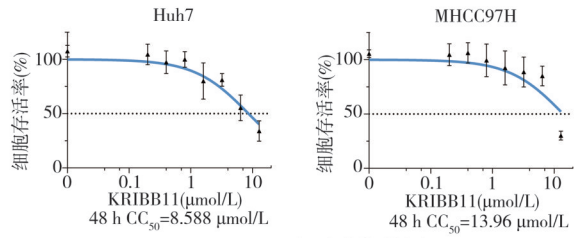


注：a，与未处理组比较，$P<0.05$；b，与未处理组比较，$P<0.001$；c，与仅过表达 HBx 组比较，$P<0.001$

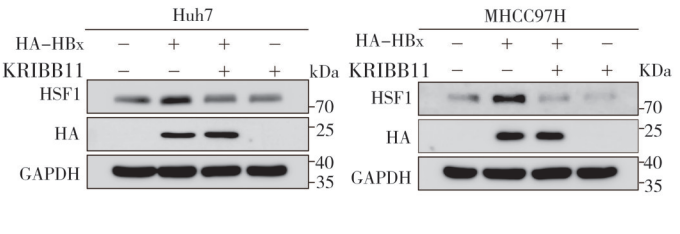
图 3　过表达 HBx 后敲低 HSF1 肝癌细胞转移、侵袭、迁移及伪足形成能力下降

组相比，HBx 表达明显增加 HCC 细胞伪足形成的数量，而 KRIBB11 处理明显减少了表达 HBx 的肝癌细胞伪足数量（图 4C，$P<0.001$）；划痕实验表明，与对照组相比，HBx 表达增强了 HCC 细胞的划痕愈合能力，KRIBB11 处理减弱了表达 HBx 肝癌细胞的划痕愈合能力（图 4D，$P<0.001$）；Transwell 实验结果表明，与对照组相比，HBx 表达增强了 HCC 细

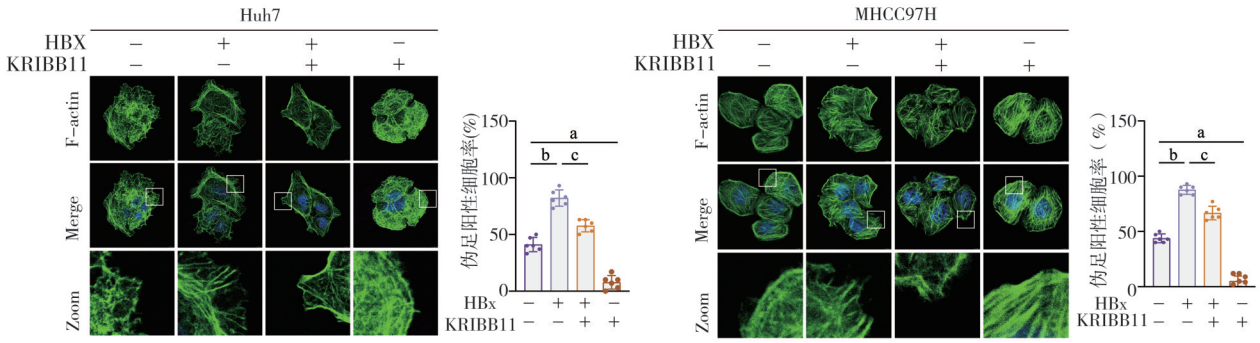
胞的迁移和侵袭能力，KRIBB11 处理减弱了表达 HBx 的 HCC 细胞迁移和侵袭能力（图 4E，$P<0.001$）。这部分的结果表明 HSF1 抑制剂明显减弱了 HBx 对 HCC 细胞迁移和侵袭能力的促进作用，提示靶向 HSF1 可缓解 HCC 的进展。



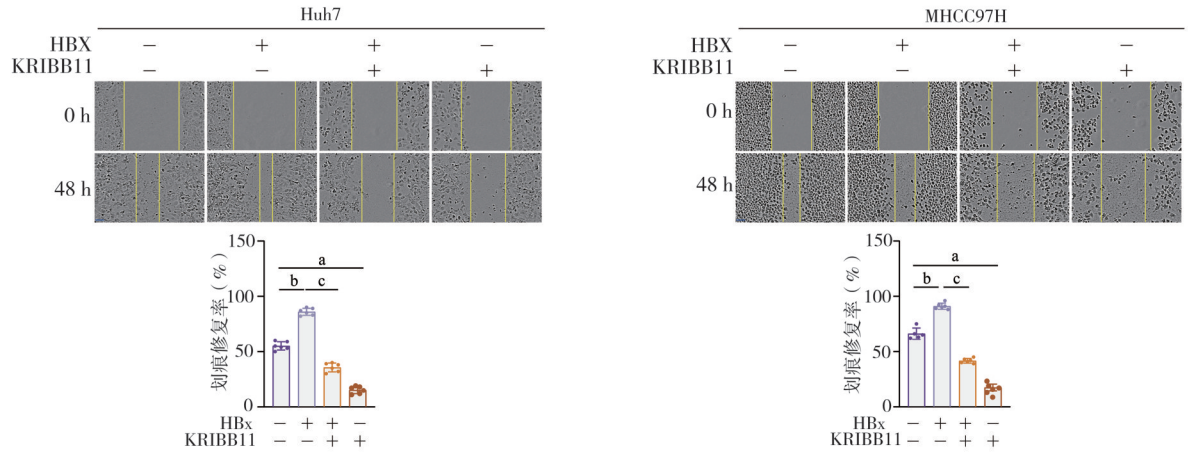
A. KRIBB11细胞毒性检测



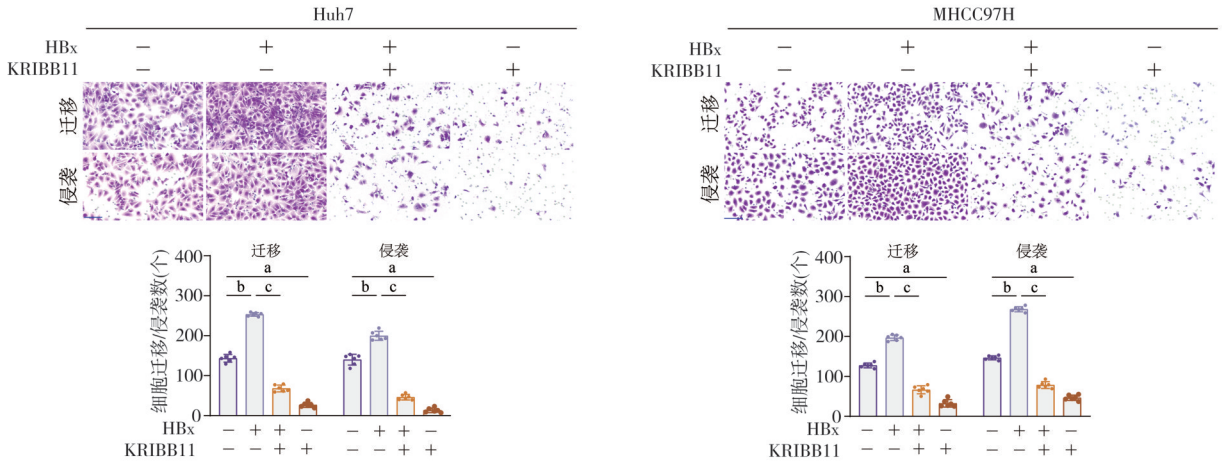
B. KRIBB11抑制HSF1的表达



C. F-肌动蛋白染色和丝状伪足分析实验检测过表达HBx后加入KRIBB11对肝癌细胞伪足形成能力的影响



D. 划痕实验检测过表达HBx后加入KRIBB11对肝癌细胞迁移能力的影响（比例尺=200 μm）



E. Transwell实验检测过表达HBx后加入KRIBB11对肝癌细胞迁移及侵袭能力的影响（比例尺=100 μm）

注：a，与未处理组比较，$P<0.05$；b，与未处理组比较，$P<0.001$；c，与仅过表达 HBx 组比较，$P<0.001$

图 4　过表达 HBx 后加入 KRIBB11 肝癌细胞转移、侵袭、迁移及伪足形成能力下降

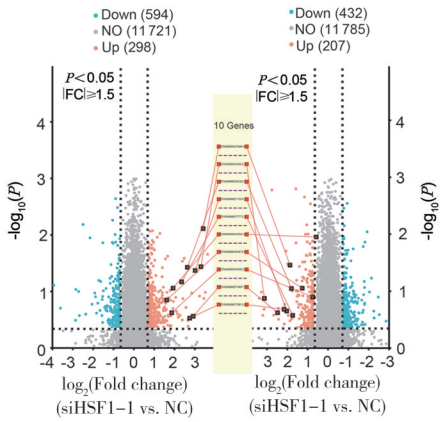
2.5 HSF1 可能通过 c-Myb 介导 HBx 对 HCC 进展的促进作用

GEO 数据集 GSE274408 包括在 Huh7 细胞中通过 RNA 干扰沉默 HSF1 后的基因表达谱，为了初步阐明 HSF1 介导 HBx 促 HCC 进展的分子机制，对该数据集进行差异表达基因分析，与对照组相比，813 个基因在 siHSF1-1 和 siHSF1-2 组差异表达（图 5A），其中均表达下调的基因 213 个（图 5B）。同时，从 HCMDB 数据库中下载了与肝细胞癌（HCC）转移相关的基因数据，将这 2 个数据集进行合并分析，得到 26 个基因。通过文献查阅，发现其中 13 个基因在肝癌的进展中发挥促进作用（图 5C）。进一步，通过细胞实验验证了 HSF1 对上述 13 个基因表达水平的影响，发现 Huh-7 细胞中 HSF1 过表达明显上调了 CRYAB、c-Myb、PLAUR 等 7 个基因的表达。为了初步判断这 7 个基因在 HSF1 介导 HBx 促 HCC 细胞迁移和侵袭中的作用，在 Huh-7 细胞中过表达 HBx，仅发现 c-Myb、S100A9、TS*PAN*8 的表达水平明显上调（图 5D）。有研究表明，c-Myb 是 HBx 的靶基因之一，在促进与肝癌的恶性进展密切相关，因此，推测 c-Myb 可能在 HSF1 介导 HCC 进展中发挥重要作用。接着，在转染了 HBx 表达质粒和靶向 HSF1 的 siRNA，Western blot 检测发现 HBx 表达明显增加 c-Myb 的蛋白质水平，而同时敲减 HSF1 则减弱了 HBx 对 c-Myb 的蛋白质水平的促进作用（图 5E）。此外，在表达 HBx 的细胞中敲减 HSF1 并过表达 c-Myb，Western blot 验证了 HSF1 的敲减效率和 c-Myb 的过表达效率（图 5F），Transwell 实验结果表明敲减 HSF1 减弱了 HBx 对 HCC 细胞的迁移和侵袭能力，而过表达 c-Myb 恢复了 HBx 对 HCC 细胞的迁移和侵袭能力的促进作用（图 5G，$P<0.001$）。

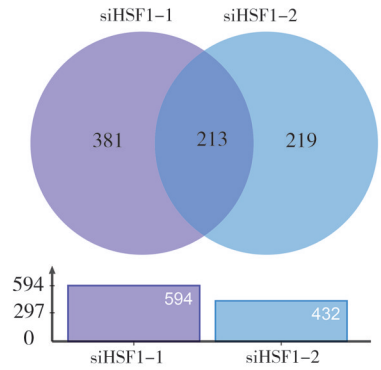
3 讨 论

在我国，HBV 感染是 HCC 发生发展的主要危险因素，而 HBx 在 HBV 诱导的 HCC 发病机制中发挥重要作用[15]。HBx 通过多种机制促进 HCC 的进展。一方面，HBx 基因整合到宿主染色体中明显影响基因组稳定性，干扰与 HCC 相关基因的表达[16]；另一方面，HBx 通过转录激活机制[17]、DNA 甲基化[18]、组蛋白表观修饰[19]、泛素-蛋白酶体系统调控[20]等调节致癌基因或抑癌基因的表达。同时，HBx 还能够诱导肝细胞氧化应激[21]、细胞凋亡[22]和 DNA 修复等促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。在本研究中，采用 4D 无标记定量蛋白质组学分析受 HBx 调控的蛋白质，结合 Western blot 实验验证，发现过表达 HBx 后显著上调了 HSF1 的蛋白表达水平，而对其 mRNA 水平无明显的影响。进一步通过蛋白稳定性实验证明 HBx 过表达增强了 HSF1 的蛋白质稳定性。已有研究表明 HBx 通过泛素化和苏木化修饰等多种机制介导蛋白质稳定调控并参与 HCC 进展。HBx 诱导染色体结构维持复合物 5/6 泛素化降解损害同源重组介导的 DNA 损伤修复促进 HCC 的发生[23]；HBx 通过抑制 E3 泛素连接酶复合物 DDB1/Cullin-4 与 WD 重复结构域蛋白 5（WD Repeat Domain 5，WDR5）相互作用增强 WDR5 的稳定性发挥促 HCC 作用[24]；此外，HBx 也可通过增加 SH3 结构域蛋白 1 的小类泛素修饰化稳定人类表皮生长因子受体 2 蛋白并促进肝癌细胞的生长和迁移[25]。这些研究揭示了泛素化和苏木化修饰在 HBx 促进 HCC 进展中的重要作用，然而 HBx 通过何种途径增强 HSF1 的蛋白质稳定性还需要进一步的研究。

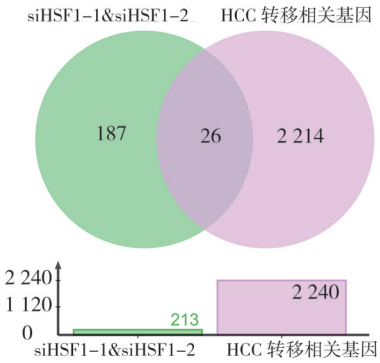
HSF1 是热休克反应的主要调节因子，在肿瘤的生长、侵袭和迁移等方面发挥了重要的作用。在本研究中，发现 HSFI 的敲减明显减弱了 HBx 所诱导的 HCC 细胞迁移和侵袭能力的增加，表明 HSF1 部分介导了 HBx 的促进 HCC 进展的作用。在肿瘤细胞中，HSF1 处于激活状态，激活的 HSF1 可通过上调乳酸脱氢酶 A[26]、丙酮酸激酶 2[27]、细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达[28]促进癌细胞增殖。在促进癌细胞转移能力方面，HSF1 通过增加 TGF-β 表达诱导癌细胞上皮间充质转化[29]；激活 E2F 转录因子家族促进肺腺癌脑转移[30]；与蛋白质精氨酸甲基转移酶 5 相互作用通过调控组蛋白甲基化修饰促进淋巴增强子结合因子 1、基质金属肽酶 9 等因子的上调促进膀胱癌转移[31]。这些研究揭示 HSF1 可通过上调多种致癌基因的表达促进肿瘤的进展。在本研究中，结合数据库分析与细胞功能实验发现 HSF1 上调了 c-Myb 的 mRNA 和蛋白水平，HSF1 介导了 HBx 对 c-Myb 的促进作用。c-Myb 是细胞中重要的转录因子，对多种肿瘤的进展具有促进作用。与本课题组的发现一致的是，已有研究发现 c-Myb 可通过增强骨调素或非编码 RNA SNHG10 和 SCARNA13 的表达在 HCC 细胞的迁移和侵袭过程中发挥促进作用[32]。本研究进一步的研究结果表明 c-Myb 过表达恢复了 HSF1 敲减 HCC 细胞的迁移和侵袭能力，初步揭示了 HBx/HSF1/c-Myb 促进 HCC 进展的作用。HSF1 是细胞应激反应信号传导的主要调节因子。HSF1 的传统作用主要是结合在热休克反应基因启动子区域的热休克元件激活热休克蛋白家族的转录以保护细胞免受蛋白毒性应激诱



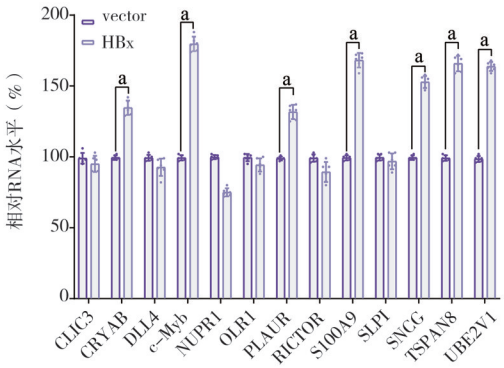
A. siHSF1 RNA-Seq分析差异表达基因

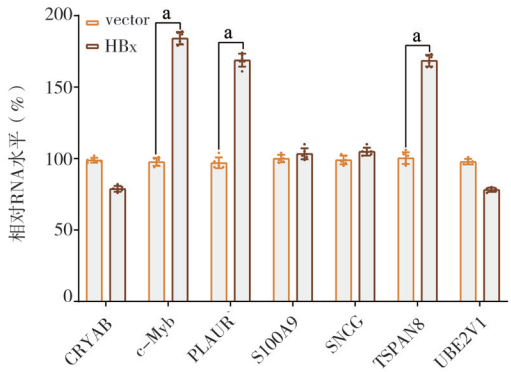


B. HSF1沉默下调基因共213个

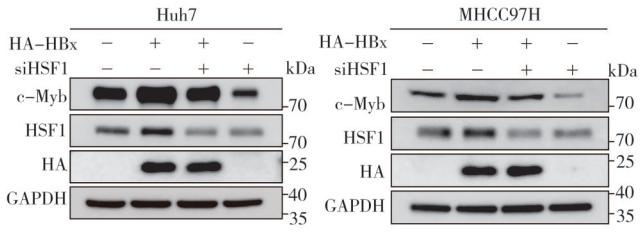


C. 与HCMDB数据库合并分析

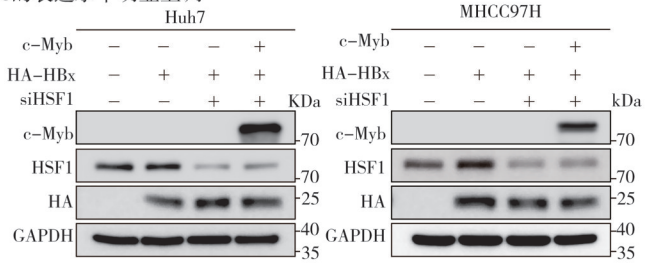




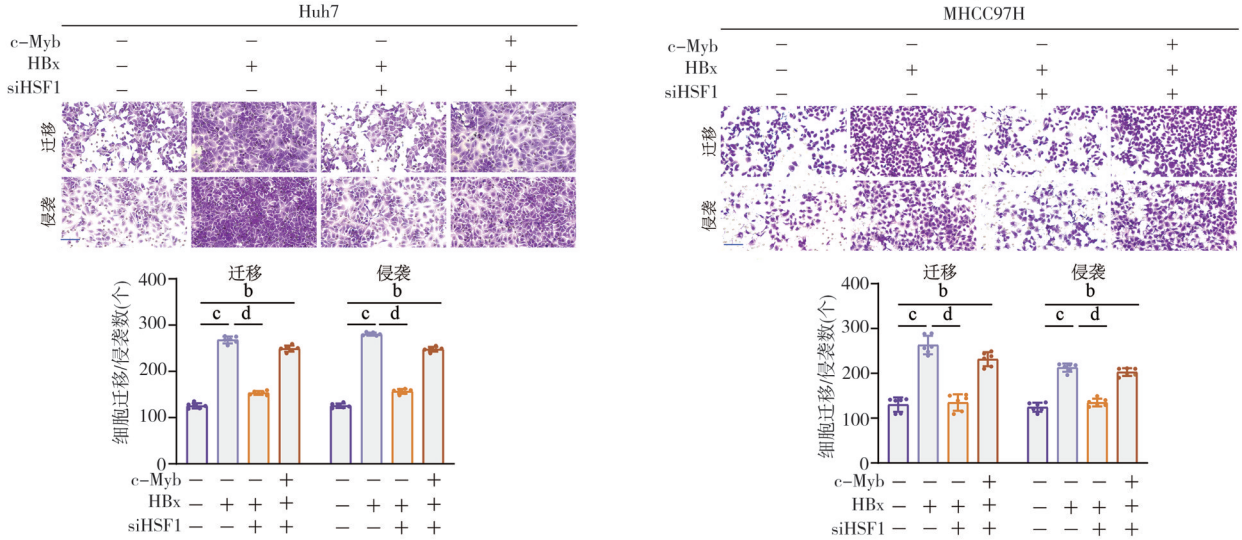
D. c-Myb、S100A9、TSPAN8的表达水平明显上调



E. HBx 上调 c-Myb，HSF1 敲减削弱其效应



F. HSF1敲减与c-Myb过表达验证



G. Transwell实验检测HSF1敲减后c-Myb恢复HBx对肝癌细胞Huh7及MHCC97H迁移及侵袭能力的影响（比例尺=100 μm）

注：a，与未处理组比较，$P<0.05$；b，与未处理组比较，$P<0.001$；c，与仅过表达 HBx 组比较，$P<0.001$；d，与对照组比较，$P<0.05$

图5　沉默HSF1下调促转移相关蛋白c-Myb的表达

导的损伤[33]。近年来，新的证据表明HSF1也可与多种蛋白相互作用调控基因的转录。研究发现HSF1在非应激条件下与c-MYC/MYC-相关因子X复合物相互作用，从而促进c-MYC的转录活性[34]；HSF1与PRMT 5相互作用，影响组蛋白甲基化并调控多种癌基因的表达[31]；HSF1招募乙酰基转移酶P300增强LINC00857表达[35]；HSF1与p53形成复合物，增强其转录活性，调控p21的动态变化[36]。下一步需要鉴定HSF1是否直接结合于c-Myb启动子区域激活其转录或者通过与其他蛋白相互作用间接促进其表达，以阐明HSF1促进c-Myb表达的分子机制。

此外，本研究还发现HSF1抑制剂KRIBB11处理明显减弱了HBx对HCC进展的促进作用，表明了HSF1作为靶点在抗HBV相关性HCC方面的潜在价值。与本研究的发现一致的是靶向HSF1在多种肿瘤中同样具有较好的应用前景，如NXP800直接作用于HSF1导致多发性骨髓瘤凋亡[37]；CCT251236抑制HSF1转录缓解卵巢癌进展[38]；KNK437靶向AKT/HSF1抑制乳腺癌、结肠癌生长等[39]。然而HSF1抑制剂在临床应用中都有其局限性。HSF1在应激状态下的癌细胞和正常细胞中都发挥着重要作用。抑制HSF1在发挥抗癌作用的同时对正常细胞不应具有毒性。因此，对于其在癌症治疗中的应用来说，需要对现有靶向HSF1化合物进行结构改造以使其特异性地识别和靶向癌细胞，并对正常细胞的细胞毒性作用最小化，例如，通过改变官能团/基序的合成方法，或者发现和分离能够克服潜在脱靶问题的新天然产物等。

本研究发现HBx通过增强HSF1蛋白稳定性促进其表达，HSF1进一步激活c-Myb的表达，从而促进HCC细胞的迁移和侵袭，HSF1抑制剂KRIBB11能够缓解HBx诱导的HCC的进展。综上，本研究揭示了HBx/HSF1/c-Myb调控轴在HCC细胞迁移和侵袭中的作用，为干预HBV相关性肝癌的进展提供了潜在的靶点。然而，本研究仍需要解决以下不足之处：①HBx增强HSF1蛋白质稳定性的分子机制有待阐明；②HSF1激活c-Myb表达的作用机制需要进一步解析；③需在动物模型中验证KRIBB11减缓HBx诱导的肝癌进展，以为明确HBx/HSF1/c-Myb调控轴在HCC进展中的重要作用提供理论和实验支撑。

参 考 文 献

[1] Singal AG, Kanwal F, Llovet JM. Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: implications for screening, prevention and therapy[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20(12): 864-884.

[2] Hsu HY, Tang JH, Huang SF, et al. Recurrence pattern is an independent surgical prognostic factor for long-term oncological outcomes in patients with hepatocellular carcinoma[J]. Biomedicines, 2024, 12(3): 655.

[3] Younossi ZM, Wong G, Anstee QM, et al. The global burden of liver disease[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2023, 21(8): 1978-1991.

[4] Levrero M, Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2016, 64(1): 84-101.

[5] Wang Z, Li N, Cai P, et al. Mechanism of HBx carcinogenesis interaction with non-coding RNA in hepatocellular carcinoma[J]. Front Oncol, 2023, 13: 1249198.

[6] Huang FY, Wong DK, Mak LY, et al. Hepatitis B virus X protein promotes hepatocarcinogenesis *via* the activation of HMGA2/STC2 signaling to counteract oxidative stress-induced cell death[J]. Carcinogenesis, 2022, 43(7): 671-681.

[7] Sivasudhan E, Blake N, Lu ZL, et al. Hepatitis B viral protein HBx and the molecular mechanisms modulating the hallmarks of hepatocellular carcinoma: a comprehensive review[J]. Cells, 2022, 11(4): 741.

[8] Lin X, Li AM, Li YH, et al. Silencing MYH9 blocks HBx-induced GSK3β ubiquitination and degradation to inhibit tumor stemness in hepatocellular carcinoma[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 13.

[9] Geng X, Huang CH, Qin Y, et al. Hepatitis B virus X protein targets Bcl-2 proteins to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(45): 18471-18476.

[10] Lara-Pezzi E, Serrador JM, Montoya MC, et al. The hepatitis B virus X protein (HBx) induces a migratory phenotype in a CD44-dependent manner: possible role of HBx in invasion and metastasis[J]. Hepatology, 2001, 33(5): 1270-1281.

[11] Jiang S, Tu K, Fu Q, et al. Multifaceted roles of HSF1 in cancer [J]. Tumour Biol, 2015, 36(7): 4923-4931.

[12] Shen JH, Chen PH, Liu HD, et al. HSF1/AMPKα2 mediated alteration of metabolic phenotypes confers increased oxaliplatin resistance in HCC cells[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(11): 2349-2363.

[13] Xi CX, Hu YZ, Buckhaults P, et al. Heat shock factor Hsf1 cooperates with ErbB2 (Her2/Neu) protein to promote mammary tumorigenesis and metastasis[J]. J Biol Chem, 2012, 287(42): 35646-35657.

[14] Lee S, Jung J, Lee YJ, et al. Targeting HSF1 as a therapeutic strategy for multiple mechanisms of EGFR inhibitor resistance in EGFR mutant non-small-cell lung cancer[J]. Cancers, 2021, 13(12): 2987.

[15] Himanen SV, Puustinen MC, Da Silva AJ, et al. HSFs drive transcription of distinct genes and enhancers during oxidative stress and heat shock[J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(11): 6102-6115.

[16] Sivasudhan E, Blake N, Lu ZL, et al. Hepatitis B viral protein HBx and the molecular mechanisms modulating the hallmarks of hepatocellular carcinoma: a comprehensive review[J]. Cells, 2022, 11(4): 741.

[17] Zhang F, Wang Q, Ye LH, et al. Hepatitis B virus X protein upregulates expression of calpain small subunit 1 *via* nuclear factor-kappaB/p65 in hepatoma cells[J]. J Med Virol, 2010, 82(6): 920-928.

[18] Park IY, Sohn BH, Yu E, et al. Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein[J]. Gastroenterology, 2007, 132(4): 1476-1494.

[19] Tornesello ML, Annunziata C, Tornesello AL, et al. Human oncoviruses and p53 tumor suppressor pathway deregulation at the origin of human cancers[J]. Cancers, 2018, 10(7): 213.

[20] Minor MM, Slagle BL. Hepatitis B virus HBx protein interactions with the ubiquitin proteasome system[J]. Viruses, 2014, 6(11): 4683-4702.

[21] Yu DY. Relevance of reactive oxygen species in liver disease observed in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X protein[J]. Lab Anim Res, 2020, 36: 6.

[22] Knoll S, Fürst K, Thomas S, et al. Dissection of cell context-dependent interactions between HBx and p53 family members in regulation of apoptosis: a role for HBV-induced HCC[J]. Cell Cycle, 2011, 10(20): 3554-3565.

[23] Sekiba K, Otsuka M, Funato K, et al. HBx-induced degradation of Smc5/6 complex impairs homologous recombination-mediated repair of damaged DNA[J]. J Hepatol, 2022, 76(1): 53-62.

[24] Gao WW, Jia ZC, Tian Y, et al. HBx protein contributes to liver carcinogenesis by H3K4me3 modification through stabilizing WD repeat domain 5 protein[J]. Hepatology, 2020, 71(5): 1678-1695.

[25] You HJ, Yuan DC, Li Q, et al. Hepatitis B virus X protein increases LASP1 SUMOylation to stabilize HER2 and facilitate hepatocarcinogenesis[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 226: 996-1009.

[26] Zhao YH, Zhou M, Liu H, et al. Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth[J]. Oncogene, 2009, 28(42): 3689-3701.

[27] Chen BX, Yang B, Zhu J, et al. Hsp90 relieves heat stress-induced damage in mouse kidneys: involvement of antiapoptotic PKM2-AKT and autophagic HIF-1α signaling[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(5): 1646.

[28] Yang WL, Feng BQ, Meng YH, et al. FAM3C-YY1 axis is essential for TGFβ-promoted proliferation and migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells *via* the activation of HSF1[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(5): 3464-3475.

[29] Lou Q, Li YY, Hou BB, et al. Heat shock transcription factor 1 affects kidney tubular cell migration by regulating the TGF-β1-Smad2/3 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2019, 20(5): 4323-4330

[30] Hoj JP, Mayro B, Pendergast AM. The ABL2 kinase regulates an HSF1-dependent transcriptional program required for lung adenocarcinoma brain metastasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(52): 33486-33495.

[31] Huang M, Dong W, Xie RH, et al. HSF1 facilitates the multistep process of lymphatic metastasis in bladder cancer *via* a novel PRMT5-WDR5-dependent transcriptional program[J]. Cancer Commun, 2022, 42(5): 447-470.

[32] Lan T, Yuan KF, Yan XK, et al. LncRNA SNHG10 facilitates hepatocarcinogenesis and metastasis by modulating its homolog SCARNA13 *via* a positive feedback loop[J]. Cancer Res, 2019, 79(13): 3220-3234.

[33] Davies AE, Kortright K, Kaplan KB. Adenomatous polyposis coli mutants dominantly activate Hsf1-dependent cell stress pathways through inhibition of microtubule dynamics[J]. Oncotarget, 2015, 6(28): 25202-25216.

[34] Xu M, Lin L, Ram BM, et al. Heat shock factor 1 (HSF1) specifically potentiates c-MYC-mediated transcription independently of the canonical heat shock response[J]. Cell Rep, 2023, 42(6): 112557.

[35] Shen Q, Wang R, Liu XL, et al. HSF1 stimulates glutamine transport by super-enhancer-driven lncRNA LINC00857 in colorectal cancer[J]. Cancers, 2022, 14(16): 3855.

[36] Oda T, Sekimoto T, Kurashima K, et al. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts[J]. J Cell Sci, 2018, 131(9): jcs210724.

[37] Fok JHL, Hedayat S, Zhang L, et al. HSF1 is essential for myeloma cell survival and A promising therapeutic target[J]. Clin Cancer Res, 2018, 24(10): 2395-2407.

[38] Elisa Pasqua A, Sharp SY, Chessum NEA, et al. HSF1 pathway inhibitor clinical candidate (CCT361814/NXP800) developed from a phenotypic screen as a potential treatment for refractory ovarian cancer and other malignancies[J]. J Med Chem, 2023, 66(8): 5907-5936.

[39] Kang MJ, Jung SM, Kim MJ, et al. DNA-dependent protein kinase is involved in heat shock protein-mediated accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxic preconditioned HepG2 cells [J]. FEBS J, 2008, 275(23): 5969-5981.

（责任编辑：李青颖）

本文引用格式：

展宗祝，汪春朵，何思怡，等. HSF1 在 HBx 促进肝细胞癌进展中的作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2025，50(5)：612-622.